



①9 **BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND**



**DEUTSCHES
PATENT- UND
MARKENAMT**

⑫ **Offenlegungsschrift**
⑩ **DE 198 28 837 A 1**

⑤1 Int. Cl.⁶:
G 01 N 33/543
B 01 L 3/00
C 12 M 1/34
C 12 Q 1/00

②1 Aktenzeichen: 198 28 837.9
②2 Anmeldetag: 27. 6. 98
④3 Offenlegungstag: 22. 4. 99

Mit Einverständnis des Anmelders offengelegte Anmeldung gemäß § 31 Abs. 2 Ziffer 1 PatG

⑦1 **Anmelder:**
Schwertner, Heiko, Dr., 59387 Ascheberg, DE;
Dewair, Mahmoud, Dr., 48163 Münster, DE

⑦2 **Erfinder:**
gleich Anmelder

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

⑤4 **Verfahren und Vorrichtung mit Minihohlzylindern als Festphase für enzymatische, immunologische und molekularbiologische Analyseverfahren**

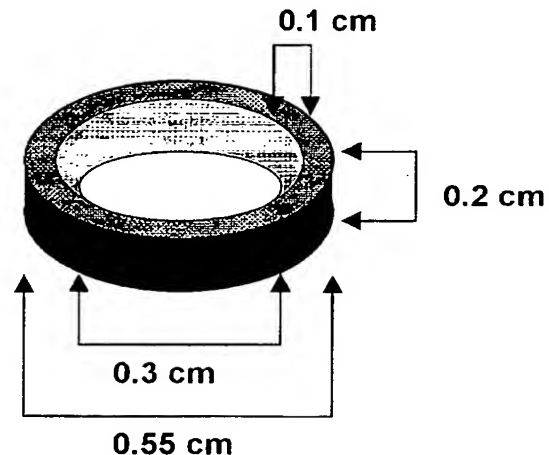
⑤7 **Zielsetzung**
Die Erfindung hat das Ziel, von heute bestehenden Analyseverfahren im Bereich der enzymatischen, immunologischen und molekularbiologischen Tests (allgemein ELISA Techniken), die eine Festphase verwenden, deren Nachteile zu beseitigen. Dies soll mit einer Kostensenkung und einer Qualitätssteigerung verbunden werden, ohne daß neue Analysengeräte entwickelt werden müssen.

Lösung des Problems

Zur Lösung des Problems werden Minizylinder als Festphase in allen bestehenden ELISA Analyseverfahren eingesetzt. Minizylinder im Sinne der Erfindung sind Körper, die eine durchgängige Ausnehmung besitzen, wie z. B. gerade, runde oder vieleckige Hohlzylinder oder Ringe. Die Minizylinder können aus Glas, Kunststoffen, Papier oder Metall bestehen.

Anwendungsgebiete

Die Erfindung betreffenden Minizylinder können bei allen bekannten Detektions- und Markierungsverfahren im Bereich der ELISA Techniken eingesetzt werden. Durch deren einfache Produktionsmöglichkeiten sowie deren einfache Aktivierungsmöglichkeiten mit erprobten Verfahren ist die Herstellung kostengünstiger Testkits möglich. Aus der weiten Bemaßungsmöglichkeit resultiert, daß die Minizylinder mit allen aktuell verwendeten Reaktionsgefäßen wie MTP, Röhrchen usw. eingesetzt werden können. Werden die Minizylinder aus Metall gefertigt, so ist eine einfache Vollautomatisierung von Testkits möglich, da eine Positionsveränderung mittels Elektromagnetismus realisierbar ist. Ferner ist eine über elektromagnetische ...



DE 198 28 837 A 1

BEST AVAILABLE C

DE 198 28 837 A 1

Beschreibung

Einleitung

Die Erfindung hat das Ziel, mit Minihohlzylindern als Festphase enzymatische, immunologische und molekularbiologische Analyseverfahren durchzuführen. Als Minizylinder werden Körper bezeichnet die eine durchgängige Ausnehmung besitzen und deren Seitenfläche nicht vernachlässigt werden kann, wie z. B. ein Minihohlzylinder oder kurz Minizylinder (MZ). Ein Ring ist dem Minizylinder gleich zuzurechnen, da der einzige Unterschied zum Zylinder darin besteht, daß ein Zylinder eine gerade Seitenfläche besitzt und der Ring eine runde Seitenfläche. Die Erfindung betreffenden Minizylinder ermöglichen es, alle bekannten Detektionsverfahren und Markierungsverfahren der oben genannten Analyseverfahren zu verwenden. Enzymatische, immunologische und molekularbiologische Analyseverfahren können zusammenfassend als ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay) bezeichnet werden.

ELISA ist ein weitverbreitetes Labortestverfahren bei dem bioorganische Moleküle nachgewiesen und quantitativ bestimmt werden können. Diese bioorganische Moleküle können Antigene, Antikörper, Hormone, Hormonrezeptoren, biochemische Botenstoffe, Medikamente, Drogen und andere Analyten in den Körperflüssigkeiten von Mensch und Tier sein. Die ELISA Verfahren haben sich auch als nützlich für den Nachweis und die Bestimmung von verschiedenen unverträglichen Umweltschadstoffen wie Pestizide, Insektizide im Wasser, Boden und in Lebensmitteln bewährt. Gerade in der Lebensmittelüberwachung werden ELISA Techniken eingesetzt um verbotene Additive wie Masthormone, organische Giftstoffe, Mykotoxine nachzuweisen und quantitativ zu bestimmen.

ELISA Testverfahren werden prinzipiell nach den in Fig. 1 dargestellten Schritten [Fig. 1, Schritte 1-1 bis 3-2] durchgeführt. Dabei wird eine sogenannte Festphase (F) [Fig. 1, 1] verwendet. Der Begriff Festphase bezieht sich auf eine stabile während der Reaktion innerte Substanz, wie zum Beispiel Kunststoffe (Polyesterole, Nylon, Polyacryl etc.), Papier, Glas oder Keramik. Diese Festphase muß chemisch oder physikalisch aktivierbar sein.

Es sind eine Vielzahl von Verfahren bekannt, mit denen eine Aktivierung oder chemische Modifizierung dieser Festphasen möglich ist. Diese Aktivierungen oder chemische bzw. physikalische Modifizierungen haben das Ziel, daß Substanzen an diesen Oberflächen gebunden (meist kovalent) werden können. Nach der Aktivierung trägt die aktivierte Festphase (aF) [Fig. 1, 2] trägt auf ihrer Oberfläche Bindungsstellen (BS) [Fig. 1, 3] die fähig sind, bioorganische Moleküle wie Antigenmoleküle (AG) [Fig. 1, 4], meist kovalent, zu binden. Ebenso können Antikörper (AB), Hormone, Hormonrezeptoren, biochemische Botenstoffe, Medikamente, Drogen etc. können ebenfalls gebunden werden.

Durch die Bindung wird eine räumliche Fixierung erreicht, mit der man in der Lage ist verschiedenen Schritte wie Waschungen, Inkubationen, Messungen, etc. durchzuführen, ohne das es zu einer Vermengung der gebundenen Substanz (Bioorganische Moleküle wie Antigene) mit der Reaktionslösung kommt. Somit ist man in der Lage die an der Festphase gebundene Substanz mit Flüssigkeitsproben wie Serumproben zu inkubieren. Dort findet eine meist bekannte und gewünschte Reaktion zwischen der oder den gebundenen und den sich in Lösung befindlichen Substanzen statt. Auf diese Weise können z. B. im Serum vorhandene spezifische primäre Antikörper (pAB) aus einem Gemisch pAB [Fig. 1, 6] gebunden werden [Fig. 1, Schritt 2-2].

Nach dieser ersten Inkubation [Fig. 1, Schritt 2-1 bis 2-2]

findet mindestens eine zweite Inkubation [Fig. 1, Schritt 3-1 bis 3-2] statt. Diese zweite Inkubation wird in der Regel mit einer Detektor haltigen Lösung durchgeführt. Nach jeder Inkubation wird ein Waschvorgang unternommen, um überflüssige Moleküle zu beseitigen. Als Detektor können z. B. markierte sekundäre Antikörper (sAB) [Fig. 1, 7] dienen. Diese können unter anderem mit Enzymen (E) oder einem Farbstoff (F) gekoppelt sein [Fig. 1, 8]. Die Enzyme erzeugen ein meßbares Signal [Fig. 1, 9]. Allgemein dienen die Detektormoleküle dazu ein meßbares Signal zu erzeugen. Dabei ist die Menge der erzeugten Signale proportional der Konzentration der pAB. Auf diese Weise läßt sich die Konzentration der pAB bestimmen. Die erzeugten Signale müssen auf den verwendeten Detektor abgestimmt sein, so können Farbmoleküle oder Strahlungen wie UV, IR, radioaktive-, fluorescence-, oder chemoluminescence Strahlungen verwendet werden.

Als Festphasenformen gibt es eine Vielzahl von Ausführungen, so werden z. B. Röhrchen (verschiedener Größen), Mircotiterplatten (MTP), Kugeln oder Scheiben verwendet. In der Praxis haben sich insbesondere die Mircotiterplatten (MTP) durchgesetzt, für die es eine große Anzahl von Geräten aller Art gibt. In praktisch jedem Labor ist eine vollständige Ausrüstung zur Durchführung von Tests in MTP vorhanden.

Stand der Technik

Nach dem heutigen Stand der Technik werden ELISA Techniken auf verschiedenen Festphasen durchgeführt. Die Form der Festphasen variiert stark, so werden z. B. Scheiben, Streifen, Quadrate, etc. verwendet. Diese Festphasen werden dazu genutzt Analyten oder Nachweissubstanzen zu binden. Die Art der Bindung ist je nach Einsatzgebiet verschieden, so werden z. B. kovalenten Bindungen oder elektrostatische Bindungen ausgenutzt.

In der Praxis haben sich neben Röhrchen insbesondere die Mircotiterplatten (MTP) durchgesetzt, für die es eine große Anzahl von Geräten aller Art gibt. Mircotiterplatten bestehen aus kleine miteinander verbundenen Bechern auch Kavitäten (Englisch auch Well) genannt. Ein Standardmaß einer MTP sind 8 mal 12 Kavitäten, mit einem Gesamtvolumen von 300 µl pro Kavität. Die Fläche aus 8 mal 12 Kavitäten wird MTP genannt. Die Kavitäten werden sowohl als reines Reaktionsgefäß, als auch als Festphase (innere Oberfläche) für ELISA Techniken verwendet.

Die geometrische Form der MTP Kavitäten hat sich als sehr nützlich für die Durchführung von ELISA's erwiesen. Der Hauptvorteil der Brunnen liegt darin, daß ein Teil der inneren Oberfläche auch als Festphase genutzt werden kann und der gesamte Brunnen als Reaktionsgefäß. Es sind eine Vielzahl von Geräten entwickelt worden, um speziell mit MTP zu arbeiten. Für MTP gibt es Waschgeräte, Schüttelgeräte, Meßgeräte mit diversen Detektoren oder Inkubatoren.

Die Möglichkeit der Nutzung der inneren Oberfläche der Kavitäten einer MTP als Festphase ist jedoch gleichzeitig ein wesentlicher Nachteil der MTP wie auch bei den Röhrchen. Es ist notwendig jeden einzelnen Becher der MTP oder jedes Röhrchen zu beschichten. Es ist sehr aufwendig eine identische Belegung mit Molekülen zu erreichen. Diese ist aber notwendig, um die Varianzen innerhalb der Tests gering zu halten. Schon ein Unterschied von 1% in der Belegungsdichte oder Oberfläche wirkt sich signifikant in der Varianz bei den Testergebnissen aus. Dies ist für einen qualitativ hochwertigen Test nicht akzeptabel. Zur identischen Behandlung der Kavitäten wurde eine Reihe sehr aufwendiger und teurerer Geräte entwickelt.

Aus diesem Grund wurden Festphasen beschrieben die in

die MTP hineingegeben werden, wie Körper in Form von Kugeln, Partikel, Scheiben oder Quadrate. Diese lassen sich mit einfachen Methoden identisch mit Molekülen belegen, indem die gesamten Körper (mehrere tausend sind möglich) in die Beschichtungslösung geben werden. Ein Nachteil dieser Körper ist es, daß nach dem transferieren des Körpers in die MTP-Kavitäten ein Detektionsstrahl (IR, UV, etc.) immer durch das Material des Festphasenkörpers beeinflußt wird, so daß eine Messung mit dem Körper in der Lösung in der MTP nicht möglich ist.

Es ein Verfahren bekannt, das diesen Nachteil umgeht. Bei diesem Verfahren hat die Festphase die Form einer Scheibe (meist Papierscheiben). Diese Scheiben sind mittig mit einem Loch versehen, in nachfolgenden Lochscheiben genannt (Patentnummer P 41 23 324.7). Laut der Patentschrift soll es durch die mittige Öffnung ermöglicht werden, durch die Scheibe hindurch, Licht mit nur geringen Verlusten zu senden. Bei diesen Lochscheiben muß Verfahrens bedingt, ein Kompromiß zwischen maximaler Oberfläche, maximaler Öffnungsweite und noch vertretbarer Stabilität eingegangen werden. Dies führt automatisch dazu, daß die Öffnungsweite geringer eingestellt werden muß, als es wünschenswert ist.

Die Nachteile der beschriebenen Verfahren liegen auf der Hand. Bei Festphasen ohne Lochung, ob als Fläche oder Körper, ist man nur in der Lage Licht oder Strahlung ohne Verlust an Energie an den Körpern vorbei zu leiten. Wird die Strahlung oder das Licht dennoch durch die Festphase geleitet, hat dies immer Veränderungen der Eigenschaften der Strahlung oder des Lichtes zur Folge.

Werden flache Festphasen wie Scheiben mit Lochung verwendet, so kann Licht mit nur geringen Verlusten durch die Lochung gesandt werden [Fig. 2, A/B 6]. Nachteil dieser Methode ist es das die Lochung nur einen beschränkten Teil der Fläche einnehmen darf. Der andere Teil der Fläche wird dazu benötigt, den jeweiligen gewünschten Stoff zu binden. Deshalb wird trotz der Lochung ein großer Teil der Strahlung absorbiert oder was schwieriger zu Handhaben ist verändert (z. B. durch Streuung [Fig. 2, 5], Änderung der Wellenlänge oder der Polarisation etc. [Fig. 2, A/B 7] [Fig. 2, A].

Ferner ist nicht gewährleistet, daß die gelochte Scheibe, gleich welchen Materials, sich mittig im Strahlengang befindet, um ein Maximum an Strahlungsenergie unverändert hindurch zulassen. Dies führt dazu, daß ein gewisses Maß an Meßwertschwankungen in Kauf genommen wird. Die Adhärenz sich mit den weiteren Meßwertschwankungen eines Analyseverfahrens. Die Beschriebenen Nachteile haben dazu geführt, daß die Lochscheiben sich in der Praxis nicht durchsetzen konnten. Seit Einführung der Papierlochscheibe vor ca. fünf Jahren gibt es nur eine beschränkte Anwendung bei semiquantitativen Allergiediagnostik und es wird voraussichtlich sich keine neue Anwendung ergeben.

Alle die zuvor beschriebenen Festphasenkörper können nicht mit vertretbarem Aufwand zur Verwendung in vollautomatisierbaren Verfahren eingesetzt werden.

Vorteile der Erfindung

Der erfindungsgemäße Einsatz von Minizylindern bietet mehrere Vorteile. Ein Minizylinder ermöglicht es, daß Strahlung oder Licht verschiedener Wellenlänge oder Polarisation durch den Minizylinder geleitet werden kann, ohne daß das Randmaterial die Eigenschaften beeinflußt [Fig. 2, B]. Ein Minihohlzylinder oder Minizylinder (MZ) besitzt eine große Öffnungsweite und muß somit nicht so exakt mittig in den Strahlungsgang gebracht werden wie z. B. eine Lochscheibe [Fig. 2, A].

Erfindungsgemäße Minizylinder gleich welcher Querschnittsform (rund, quadratisch oder vieleckig) und Querschnittsweite benötigen keine besonderen und aufwendigen Herstellungsverfahren. Es können ferner alle heute bekannten und auch zukünftige Trägermaterialien zum Aufbau von Minizylindern herangezogen werden.

Hohlzylinder können aufgrund ihrer einfachen Bauweise in vielen bestehenden Reaktionsgefäßen insbesondere MTP Kavitäten verwendet werden. Somit können alle vorhandenen Analysegeräte und Verfahren eingesetzt werden. Dafür sind keine Änderungen der Analysemethode oder der Analysegerätschaft notwendig.

Werden die Minizylinder aus magnetischem Material, wie Metall Minizylinder, Kunststoffe (z. B. Polyacrylamid, Nylon, Polyacryl etc.) mit eingebetteten Eisenpartikeln oder induktiven Material wie elektrisch leitender Kunststoffen oder Aluminium gefertigt, so können einfache und weitläufig bekannte elektromagnetische Transportverfahren verwendet werden. Diese Eigenschaft ermöglicht eine vollständige Automation von Analysemethoden, was mit den derzeit bestehenden Verfahren nicht möglich ist. In der allgemein zugänglichen Literatur sind keine aus derartigen Materialien gefertigten Minizylinder beschrieben, die bei enzymatische, immunologische und molekularbiologische Analyseverfahren Verwendung finden und zur Automation eingesetzt werden.

Oberflächen modifizierte Metallminizylinder besitzen durch ihre Dichte zwei weitere Vorteile. Zum einen bedingt durch ihre große spezifische Dichte sinken sie in wäßrigen Medien auf den Boden des Analysegefäßes und können sie ausreichend benetzt werden. Zum zweiten lassen sich metallische Minizylinder durch elektromagnetische Kräfte bewegen, z. B. in Drehung versetzen. Durch Drehung der Minizylinder um die eigene Achse ist man in der Lage eine vollständige Durchmischung berührungsfrei zu erzielen. Das hat zur Folge, daß unerwünschte Kontaminationen während des Analysevorganges ausgeschlossen werden können. Metall läßt sich über elektromagnetische Induktion erwärmen. Diese Eigenschaft kann bei Analyseverfahren dazu ausgenutzt werden konstante Temperaturen zu erzeugen.

Minizylinder können während eines Essays mit einfachen Mitteln gespült werden oder es können auch andere Operationen durchgeführt werden. Damit ist man in der Lage einen Essay auf Basis von Minizylindern schneller und kostengünstiger durchzuführen.

Aufgabe der Erfindung

Die der Erfindung zugrunde liegende Aufgabe besteht darin, die Nachteile der bestehenden Festphasenformen auszuschließen oder zu minimieren. Die bei der Erfindung verwendeten Minizylinder, schließen die Nachteile der beschriebenen Verfahren aus oder verringern sie nachhaltig. Strahlung bzw. Licht kann durch den Minizylinder ohne Verlust oder anderer nachteiliger Effekte geführt werden [Fig. 2]. Ein Ring ist dem Minizylinder gleich zusetzen, da der einzige Unterschied zum Zylinder darin besteht, daß ein Zylinder eine gerade Seitenfläche besitzt und der Ring eine runde Seitenfläche. Dadurch kann ein Minizylinder aus farbigen oder Licht undurchlässigem Material gefertigt werden. Hiermit werden nachteilige Effekte wie inneres Streulicht oder äußeres Licht stark vermindert oder verhindert [Fig. 2, 3, 4, 5]. Wird andererseits für den Minizylinder klares Material verwendet und die Einstrahlung des Meßlichts/Strahlung seitlich vorgenommen, so wird eine definierte Schichtdicke erhalten [Fig. 2, 3]. Auch dann wenn, sich Flüssigkeiten oder Gase in dem Minizylinder befinden.

Weiterhin haben Festphasen in Form von Minizylindern

gegenüber MTP Kavitäten, Scheiben oder anderen flachen Festphasen, eine wesentlich vergrößerte Oberfläche. Dadurch kann mehr Analyt gebunden werden, was einen Essay in seiner Leistungsfähigkeit deutlich verbessert. Bei einem rechnerischen Vergleich einer Lochscheibe mit einem Hohlzylinder (Bemaßung auf Standardgrößen für Microtiterplatten bezogen), ergibt sich eine mindestens 2,4fach größere Oberfläche. [Fig. 3]. Dieses Verhältnis wird noch zu Gunsten des Minizylinders verschoben, wenn die Öffnung der Lochscheibe vergrößert wird. Bei einer MTP kann zur Beschichtung nur die Bodenfläche herangezogen werden. Anderenfalls ergeben sich große Schwankungen in den Testergebnissen, da identische Oberflächenbeschichtungen nicht zu erreichen sind. Wird die zur Beschichtung nutzbare Oberfläche von MTP mit der Oberfläche von Minizylindern verglichen so ergibt sich ein Verhältnis von 3,07fachen Oberfläche.

Mathematisch muß die Scheibe als Zylinder betrachtet werden. Physikalisch betrachtet kann die Höhe jedoch vernachlässigt werden, da sie nur einen sehr kleinen Teil zu Gesamtoberfläche beiträgt.

Erfindungsgemäße Minizylinder lassen einen kontinuierlichen Strahlengang zu, damit sind kinetische Messungen, einer auf der Oberfläche stattfindenden Reaktion möglich und einfach durchzuführen [Fig. 4].

Ein Minizylinder kann in den derzeit verwendeten Reaktionsgefäßen wie Microtiterplatten (MTP), Probenröhrchen oder ähnliches eingesetzt werden, ohne daß Änderungen des apparativen Analyseaufbaus notwendig sind. Gerade für den Einsatz in MTP sind zylindrische Minizylinder geeignet, da sie in ihrer Bemaßung so angepaßt werden können, daß sie genau in eine Vertiefung (Kavitäten) passen [Fig. 3 und Fig. 5].

Durch die nachträgliche Einführung eines Bodens ist man in der Lage aus einem Minizylinder ein Gefäß zu gestalten. Was eine Erweiterung der sowieso schon vielseitigen Verwendung ermöglicht, z. B. durch Einführung einer Membran, so daß der so modifizierte Minizylinder z. B. zur Filtration eingesetzt werden kann.

Minizylinder können während eines Essays mit einfachen Mitteln gespült bzw. gewaschen oder es können weitere mechanische Operationen durchgeführt werden. Damit ist man in der Lage einen Essay auf Basis von Minizylindern schneller und kostengünstiger durchzuführen.

Ein Minizylinder kann, nach der Zugabe einer zu analysierenden Reaktionslösung, in der Reaktionslösung verbleiben und muß nicht aus der Lösung transferiert werden, was die Durchführung eines Essays wesentlich beschleunigt und eine Automatisierung ermöglicht.

Wird der Minizylinder aus magnetisierbarem Metall gefertigt, so ergeben sich weitere Vorteile. Metalle besitzen eine hohe Dichte was dazu führt, daß die Minizylinder in den Reaktionslösungen zu Boden sinken. Dies sorgt dafür, daß die Oberfläche der Körper immer benetzt ist. Da Metalle nicht lichtdurchlässig sind, wird für eine wirkungsvolle Abschirmung von Fremdlichtquellen gesorgt, die negativen Einfluß auf eine Messung haben können.

Minizylinder aus magnetisierbarem Metall können direkt zum Transport innerhalb eines Analyseautomaten herangezogen werden, in dem mit Elektromagneten ein Greifer aufgebaut wird [Fig. 6]. Damit ist eine Vollautomatisierung eines Essays realisierbar.

Metallische Minizylinder lassen sich durch elektromagnetische Kräfte bewegen, z. B. in Drehung versetzen. Durch Drehung der Minizylinder um die eigene Achse ist man in der Lage eine vollständige Durchmischung der Reaktionslösung, berührungsfrei, zu erzielen. Das hat zur Folge, daß unerwünschte Kontaminationen während des

Analysevorganges ausgeschlossen werden können und unerwünschtes Konzentrationsgefälle innerhalb der Reaktionslösungen vermieden werden können. Ferner läßt sich Metall über eine elektromagnetische Induktion erwärmen.

Diese Eigenschaft kann bei Analyseverfahren dazu ausgenutzt werden konstante Temperaturen zu erzeugen.

Ein Hohlzylinder läßt sich in Apparaturen derart einspannen, daß aus ihm direkt eine Meßzelle wird [Fig. 7]. Diese Apparaturen können sehr einfach aufgebaut werden wie es in der Zeichnung Fig. 7 ausgeführt ist.

Zusammenfassend ergeben folgende wesentliche Vorteile bei der erfindungsgemäßen Verwendung von Hohlkörper in Form von Minizylindern verschiedener Querschnittsformen oder Querschnittsweiten:

1. MZ haben eine große Oberfläche.
2. Ein freier Strahlengang ist möglich.
3. Tausende MZ können mit einer identischen Beschichtung versehen werden.
4. MTP werden nur als Reaktionsgefäße verwendet, deren angepaßten Analysegeräte können ohne technische Änderung übernommen werden.
5. MZ können in allen Reaktionsgefäßen wie Röhrchen etc. eingesetzt werden.
6. Einfache Herstellungsmöglichkeiten von MZ.
7. Die Verwendung von Metallminizylindern (mMZ) ermöglicht eine Vollautomation.
8. mMZ ermöglichen eine berührungsfreie Bewegung oder Erwärmung über Elektromagnetismus.
9. MZ lassen sich als Reaktionskammern verwenden.
10. Kosteneinsparung für den Anwender.

Ausführung der Erfindung

Die Aufgabe wird erfindungsgemäß durch die Verwendung von Minizylindern mit einer geraden runden zylindrischen Form gelöst, im Nachfolgenden auch Minizylinder (MZ) genannt. Ein Ring ist dem Minizylinder gleich zuzusetzen, da der einzige Unterschied zum Zylinder darin besteht, daß ein Zylinder eine gerade Seitenfläche besitzt und der Ring eine runde Seitenfläche. Es können neben dem runden, auch andere Querschnittsformen zur Ausführung der Zylinder gewählt werden, z. B. quadratische oder Vieleckquerschnitte. Die Höhe oder die Querschnittsweite der Zylinder können variabel dabei sein. Die Ausnahme eines MZ selbst, sollte 1 mm Durchmesser nicht unterschreiten, da moderne Photometer einen Meßstrahl von ca. 0,9 mm besitzen. In Zeichnung Nummer 5 [Fig. 5] ist ein Beispiel für eine optimierte Form eines MZ gegeben. Diese ist für MTP angepaßt.

Die erfindungsgemäßen Minizylinder können aus Kunststoffen (z. B. Polyacrylamid, Nylon, Polyacryl etc.), Glas, Keramik, Papier oder Metall gefertigt werden. Ferner können die Minizylinder aus Kunststoffen (z. B. Polyacrylamid, Nylon, Polyacryl etc.), Glas oder Papier gefertigt werden in denen magnetisierbare Metallteilchen fest eingelagert sind oder die Oberfläche kann mit solchen Teilchen beschichtet werden.

Ein Weg zur Herstellung der erfindungsgemäßen Minizylinder z. B. von geraden runden Hohlzylindern oder Ringen besteht darin, daß übliche käufliche Röhren die aus verschiedenen Materialien gefertigt sein können, senkrecht zur Längsrichtung und entsprechend der gewünschten Höhe des Minizylinders durchtrennt werden. Durch dieses Verfahren ist eine Massenproduktion solcher Minizylinder möglich. Ferner ist es möglich aus Blechen, Folien etc. die MZ herzustellen. Ein weiteres Verfahren ist der Formenguß ei-

nes MZ.

Anschließend können die Minizylinder auf übliche Weise chemisch aktiviert werden und die in inerten Puffern gelösten Substanzen oder Komponenten an diese gebunden werden. Nach einem Waschvorgang werden verbliebene aktive Restgruppen zumeist mit Ethanolamin deaktiviert bzw. neutralisiert, wonach die erfindungsgemäßen Minizylinder gebrauchsfertig sind. Sie können nun in enzymatischen, immunologischen und molekularbiologischen Analyseverfahren eingesetzt werden.

Die erfindungsgemäßen Minizylinder aus Metall oder anderen nicht direkt aktivierbaren Materialien wie Glas oder Keramik, welches nicht direkt zur Bindung von gelösten Substanzen oder Komponenten chemisch oder physikalisch aktivierbar ist, wird zuvor mit einer chemisch oder physikalisch aktivierbaren Schicht beschichtet. Diese Schicht wird an in der oben beschriebenen Weise chemisch oder physikalisch aktiviert.

Ein Weg zur Herstellung dieser erfindungsgemäßen Metallminizylinder ist das ein Kunststoff (z. B. Polyacrylamid, Nylon, Polyacryl oder andere) oder Materialien in Lösung gebracht werden. Die Metallminizylinder werden in diese Beschichtungslösung eingetaucht. Nach einer Reaktionszeit x werden die Körper aus der Lösung entfernt und das Lösungsmittel abgedampft. Die auf der Oberfläche verbliebene Schicht des gelösten Kunststoffes kann jetzt chemisch oder physikalisch modifiziert werden. Die Anlagerung von gelösten Kunststoffen wird durch eine angeraute Oberfläche erleichtert. (Hinweis: Fertige Kunststofflösungen sind käuflich zu erwerben).

Alle Formen der Minizylinder können durch eine Mechanik transportiert werden. Dabei können sowohl Saug-, als auch Greifmechanismen verwendet werden. Die Verwendung von Minizylindern aus Metall bzw. aus Kunststoffen (z. B. Polyacrylamid, Nylon, Polyacryl etc.), Glas oder Papier in denen magnetisierbare Metallteilchen eingelagert sind, ermöglicht den einfachen Einsatz von elektromagnetischen Transportverfahren. Indem einfache Transportarme mit Elektromagneten für den Transport eingesetzt werden [Fig. 6].

Ein Hohlzylinder läßt sich in Apparaturen derart einspannen, daß aus ihm direkt eine Meßzelle wird [Fig. 7]. Diese Apparaturen können sehr einfach aufgebaut werden wie es in der die Zeichnung Fig. 7 ausgeführt ist.

Bezugszeichenliste

Fig. 1 Schematische Darstellung eines ELISA Analyseverfahrens mittels Festphase

- 1 Festphase (F)
- 2 Aktivierte Festphase (aF)
- 3 Bindungsstelle (BS)
- 4 Antigenmolekül (AG)
- 5 Inaktivierte Bindungsstelle (iBS)
- 6 Gemisch primärer Antikörpermoleküle (pAB)
- 7 sekundäre Antikörper (sAB)
- 8 Enzym oder Farbstoff (E)
- 9 erzeugte Signale

Fig. 2 Vergleich des Strahlungsgangs bei Scheibe mit Lochung gegen Minizylinder

- 1 Scheibe mit Lochung
- 2 Minizylinder (Beispiel Zylinder)
- 3 Licht/Strahlung einer äußeren Quelle
- 4 Licht/Strahlung der Energiequelle
- 5 Streulicht/Strahlung
- 6 Licht/Strahlung ohne Veränderung durch Festphasenmaterial oder Form
- 7 Durchdringungslicht/Strahlung (verändert)

Fig. 4 Möglichkeiten des Strahlengangs durch einen Minizylinder

- 1 Strahlungsquelle (z. B. Licht)
- 2 Minizylinder (Beispiel gerader runder Hohlzylinder)
- 3 Energiestrahle (z. B. IR-, UV-Licht) bei Durchgang durch die Längsachse
- 4 Energiestrahle (z. B. IR-, UV-Licht) bei Durchgang durch die Seitenachse (hierbei werden die Eigenschaften des Strahls verändert)
- 5 Verwendung von Hohlzylindern oder Ringen als Einsatz in Meßgeräte am Beispiel einer UV-Messung
- 1 Flüssigkeitseinlaß
- 2 Flüssigkeitsauslaß
- 3 Hohlzylinder mit gebundener Substanz
- 4 UV-Lichtquelle
- 5 Photozelle
- 6 Mechanische Bewegungsrichtung der Vorrichtung
- 7 Mechanische Bewegungsrichtung des Hohlzylinders
- 8 Strahlengang des UV-Lichtes

Patentansprüche

1. Hohlkörper in Form eines Zylinders oder Ringes als Festphase zur Bindung von Substanzen für den Einsatz in enzymatische, immunologische und molekularbiologische Analyseverfahren, **dadurch gekennzeichnet**, daß sie eine durch gängige Ausnehmung besitzen und deren Höhe im Bezug auf die Oberfläche nicht zu vernachlässigen ist.
2. Hohlkörper nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß es sich um einen geraden runden Hohlzylinder handelt, wobei die Höhe und Weite des Zylinders variabel ist.
3. Hohlkörper nach Anspruch 1 und 2, dadurch gekennzeichnet, daß es sich um Hohlkörper mit einem vieleckigen Querschnitt handelt, wobei die Kantenlänge und Höhe des Hohlkörpers variabel ist.
4. Hohlkörper nach Anspruch 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß dieser aus Papier, Glas, Keramik, Metall oder künstlichen bzw. natürlichen Polymeren gefertigt ist.
5. Hohlkörper nach Anspruch 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß diese aus Papier, Glas, Keramik oder künstlichen bzw. natürlichen Polymeren (z. B. Polyacrylamid, Nylon, Polyacryl, Zellulose, Polylysin, etc.) gefertigt ist, in dem Metallpartikel fest eingelagert sind.
6. Hohlkörper nach Anspruch 1 bis Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, daß der Hohlkörper aus lichtundurchlässigem Material gefertigt ist.
7. Hohlkörper nach Anspruch 1 bis Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, daß der Hohlkörper aus lichtdurchlässigem Material gefertigt ist.
8. Verfahren mit den Körpern nach Anspruch 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, daß diese mit Hilfe einer Mechanik wie Greifer, Unterdrucksauger oder mit elektromagnetischen Verfahren transportiert werden und somit in automatisierten Analyseverfahren eingesetzt werden können.
9. Verfahren mit Hohlkörpern nach Anspruch 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, daß an den Hohlkörpern direkt keine Substanzen gebunden werden kann, wie Metall, Glas oder Keramik, diese aber mit einer Beschichtung auf deren Oberfläche versehen werden, die aktiviert werden kann, so daß Moleküle gebunden werden können.
10. Hohlkörper nach Anspruch 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, daß diese als Reaktionskammer in Ana-

lysegeräte eingespannt werden.

11. Hohlkörper aus Metallen oder mit Metallpartikel nach Anspruch 4 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß diese durch Elektromagnetismus bewegt werden können oder durch elektromagnetische Induktion erwärmt werden.

Hierzu 7 Seite(n) Zeichnungen

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

- Leerseite -

Fig. 1. Schematische Darstellung eines ELISA Analyseverfahrens mittels Festphase

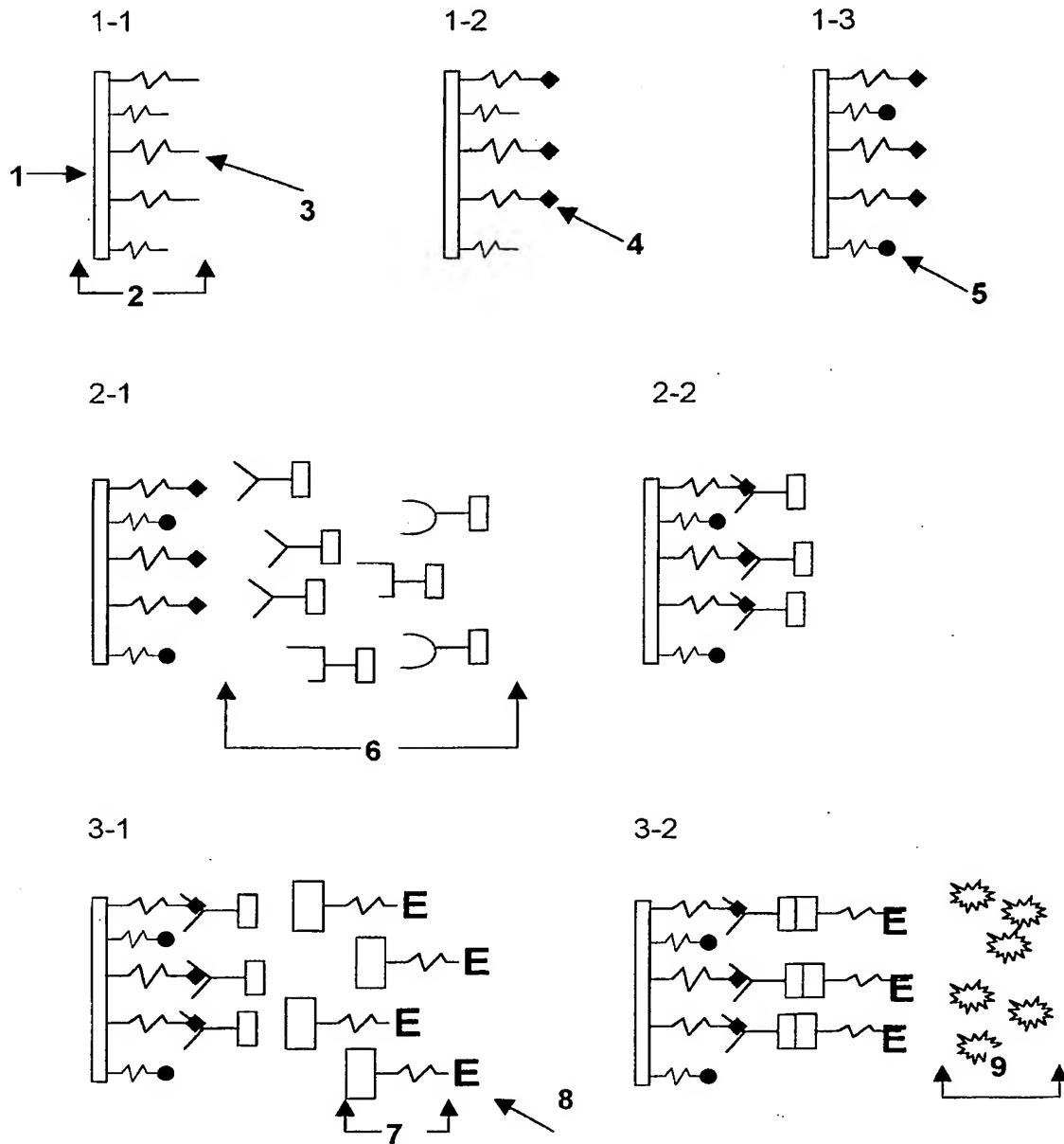


Fig.2 Vergleich des Strahlungsgangs bei Scheibe mit Lochung gegen Minizylinder

A) Scheibe mit Lochung

B) Minizylinder (Zylinder)

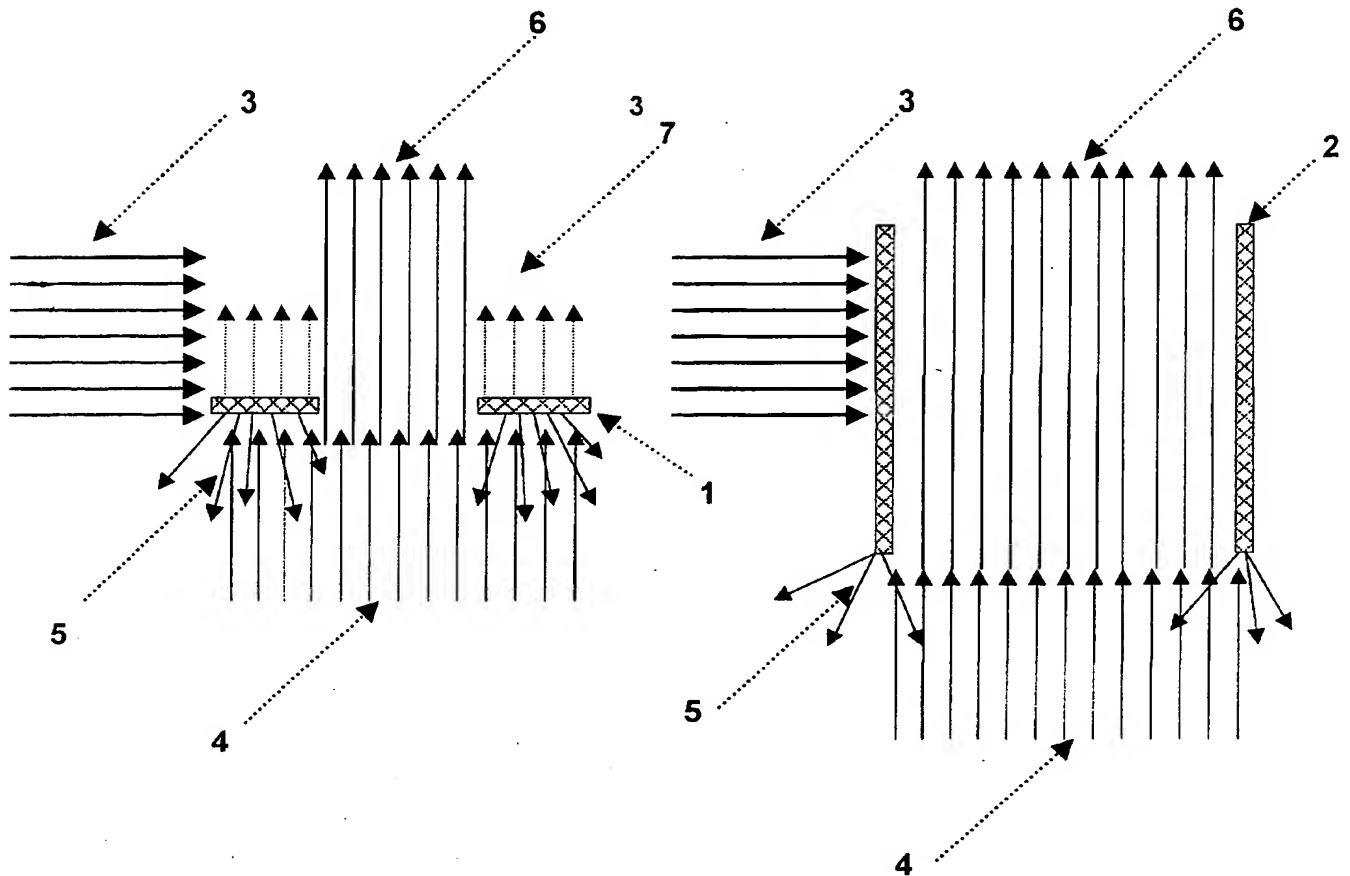


Fig.3 Vergleich der Oberflächen Berechnungsbeispiel**A] Verwendete Basisdaten:**

MTP: Durchmesser 0,6 cm
 Scheibe: Durchmesser 0,55 cm, Loch 0,3 cm, Dicke 0,01 cm
 Rundzylinder: Außendurchmesser 0,55 cm, Höhe 0,2 cm,
 Innendurchmesser 0,3 cm

Verwendete Formeln:

I) $A_o = 2\pi (r_1 + r_2) (h + (r_1 - r_2))$ (gerader Hohlzylinder)

II) $A_o = \pi r^2$

mit

A_o = Oberfläche

r_1 = äußerer Radius

r_2 = innerer Radius

h = Höhe des Rundzylinders

B] Berechnung der nutzbaren Oberfläche einer MTP Kavität

$$A_o[\text{MTP Kavität}] = \pi \times (0,3 \text{ cm})^2$$

$$A_o[\text{MTP Kavität}] = \pi \times 0,09 \text{ cm}^2$$

$$A_o[\text{MTP Kavität}] = 0,283 \text{ cm}^2 \text{ (gerundet)}$$

C] Berechnung der Oberfläche der Lochscheibe:

$$A_o[\text{Lochscheibe}] = 2\pi (0,275 + 0,15) (0,01 + (0,275 - 0,15))$$

$$A_o[\text{Lochscheibe}] = \pi \times 2 \times 0,425 \times 0,135$$

$$A_o[\text{Lochscheibe}] = 0,360 \text{ cm}^2 \text{ (gerundet)}$$

D] Berechnung der Oberfläche des geraden Hohlzylinders

$$A_o[\text{Hohlzylinder}] = 2\pi (0,275 + 0,15) (0,2 + (0,275 - 0,15))$$

$$A_o[\text{Hohlzylinder}] = \pi \times 2 \times 0,425 \times 0,325$$

$$A_o[\text{Hohlzylinder}] = 0,868 \text{ cm}^2 \text{ (gerundet)}$$

E] Direkter Vergleich der Oberflächen durch Faktorbildung

$$0,868 \text{ cm}^2_{A_o[\text{Hohlzylinder}]} / 0,360 \text{ cm}^2_{A_o[\text{Lochscheibe}]} = 2,4 \text{ (gerundet)}$$

$$0,868 \text{ cm}^2_{A_o[\text{Hohlzylinder}]} / 0,283 \text{ cm}^2_{A_o[\text{MTP Kavität}]} = 3,07 \text{ (gerundet)}$$

$$0,360 \text{ cm}^2_{A_o[\text{Lochscheibe}]} / 0,283 \text{ cm}^2_{A_o[\text{MTP Kavität}]} = 1,27 \text{ (gerundet)}$$

Fig.4 Möglichkeiten des Strahlengangs durch einen Minizylinder

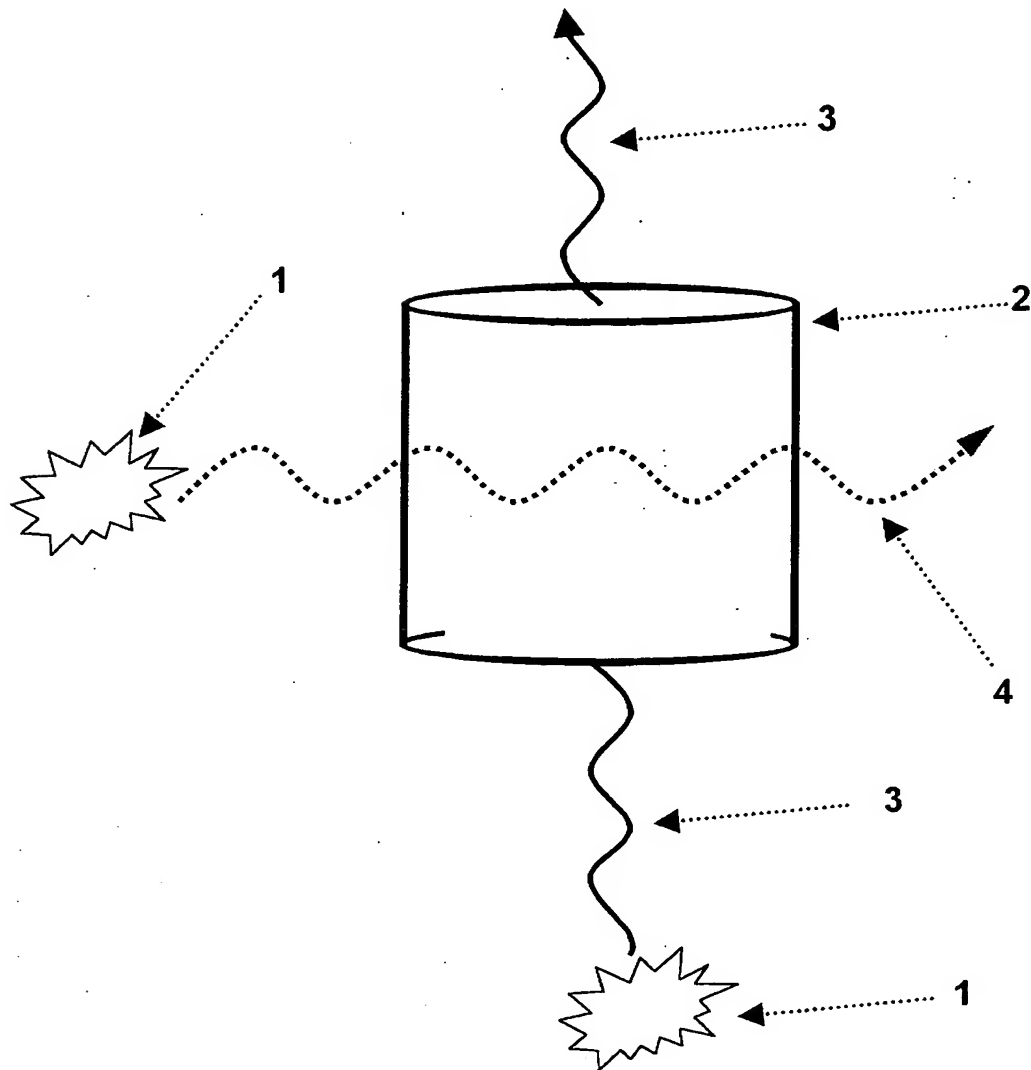


Fig. 5

Festphasenminizylinder (FMZ) (Beispiel für eine Bemaßung zur Verwendung in Microtiterplatten).

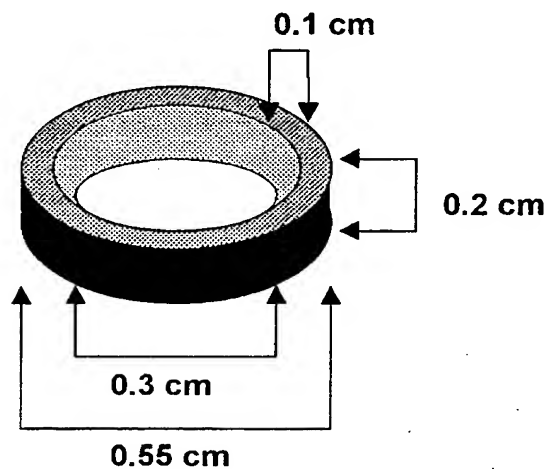
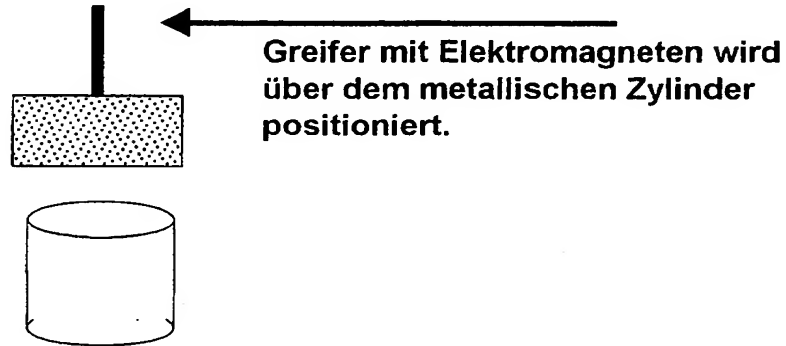
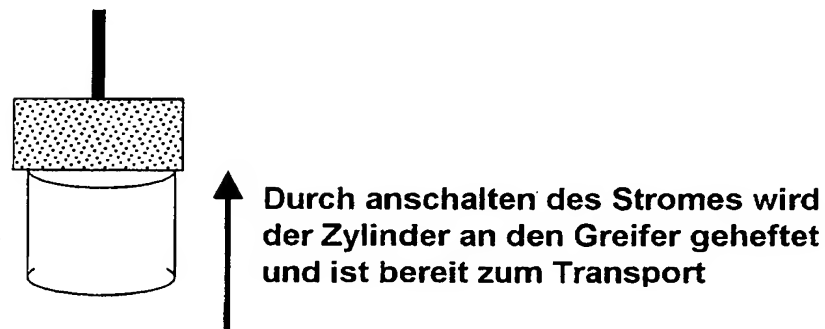


Fig.6 Transport von Minizylindern aus magnetisierbaren Materialien wie Metall oder Polymer mit eingelagerten Metallpartikeln.

1. Schritt

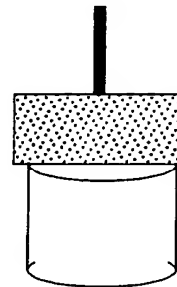


2. Schritt



3. Schritt

ein Transport durch alle drei Raumrichtungen ist möglich



4. Schritt

Durch Ausschalten des Stromes kann der Zylinder über eine definierte Position abgelassen werden

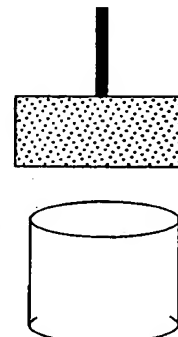
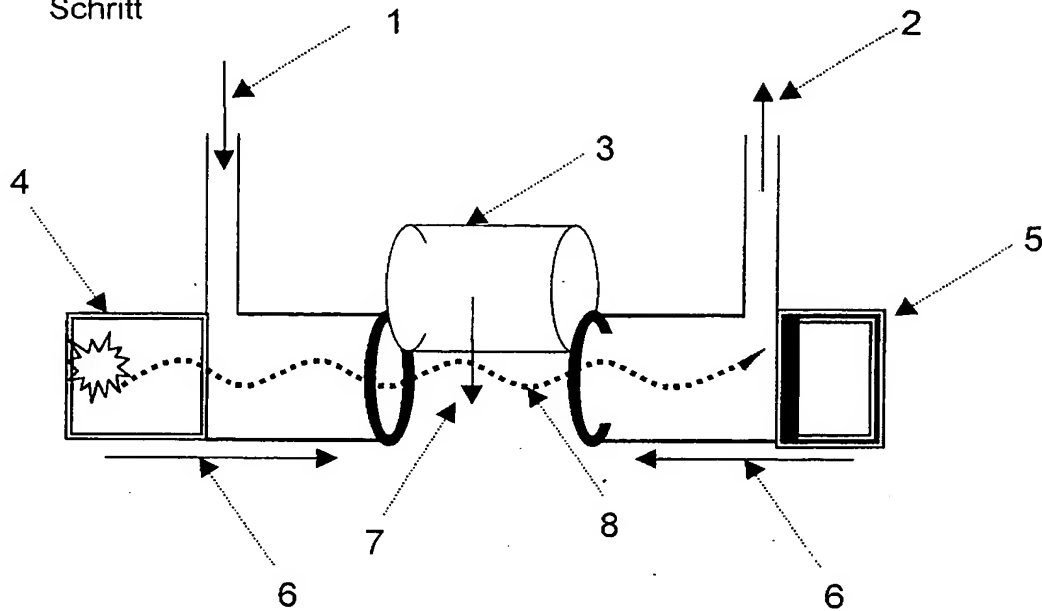


Fig.7 Verwendung von Hohlzylindern oder Ringen als Einsatz in Meßgeräte am Beispiel einer UV-Messung

1. Schritt



2. Schritt

